

ウサギ肺虚血再灌流障害モデルにおける 新しい好中球エラスターゼ特異的阻害剤の効果

金沢大学医学部医学科外科学第一講座（主任：渡辺洋宇教授）

石 川 紀 彦

近年、肺移植は確立した治療手段となりつつあるが、肺虚血再灌流障害による肺水腫、肺機能の低下は依然として極めて重要な問題である。虚血再灌流障害の原因としては、活性酸素とともに好中球の重要性が指摘されており、中でも強力な蛋白分解作用を有する好中球エラスターゼ (polymorphonuclear elastase, PMN-E) は臓器障害に深く関与していると考えられる。PMN-E特異的阻害剤による再灌流障害の抑制効果について、ウサギ肺虚血再灌流モデルを作製し検討した。ウサギの右肺門を遮断し左肺のみによる灌流を2時間行った対照群 (n=3)、左肺の常温2時間の虚血終了後、左肺のみによる2時間の再灌流を行った虚血群 (n=6)、実験開始と同時にPMN-Eの低分子合成特異的阻害剤であるN-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニルスルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸 (N-[2-[4-(2,2-dimethylpropionyloxy)phenylsulfonamino]-benzoyl]aminoacetic acid) を25mg/kg/時間を点滴静注し、虚血群と同じ方法で虚血再灌流を行ったPMN-E-I群 (n=6) の3群を作製した。対照群と比較して虚血群の動脈血酸素分圧 (arterial oxygen pressure, PaO₂)、心拍出量 (cardiac output, CO) および肺組織血流量は経時的に有意に低下し、平均肺動脈圧 (mean pulmonary arterial pressure, mPAP) および肺血管抵抗比は有意に上昇した。病理組織学的にも虚血群では肺胞隔壁、肺胞内へ著明な好中球浸潤を認め、また肺胞内出血や肺水腫も著明であった。PMN-E-I群は虚血群と比較して有意にPaO₂、COおよび肺組織血流量は高く、肺血管抵抗比は有意に低値であった。病理組織学的にも虚血群と比べて肺胞隔壁、肺胞内への好中球の浸潤、肺胞内出血、肺水腫は軽度であった。以上の結果より、PMN-E特異的阻害剤N-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニルスルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸は肺虚血再灌流障害の改善に有用な薬剤であると考えられた。

Key words ischemia-reperfusion injury, polymorphonuclear elastase, lung transplantation, neutrophil infiltration, specific neutrophil elastase inhibitor

近年、肺移植は移植手技および免疫抑制療法の進歩により、欧米では確立した治療手段となりつつある。しかし遠隔期死亡の最大の原因である閉塞性気管支炎とともに、臓器保存、虚血再灌流障害の問題は依然として解決されていない。とくに肺移植後の虚血再灌流障害による肺水腫、肺機能低下の制御は術後急性期成績の向上のために重要な問題である。虚血再灌流障害の原因としては、活性酸素とともに好中球が深く関与していると考えられ、活性化した好中球から放出される様々なサイトカインの重要性が指摘されている^{1)~3)}。中でも好中球エラスターゼ (polymorphonuclear elastase, PMN-E) は活性化した好中球より放出される強力な蛋白分解酵素であり、基質特異性が低く正常細胞を傷害し、肺においては間質成分である弾性線維を分解し肺水腫を惹起すると考えられている。本研究ではウサギの左肺門遮断による虚血再灌流モデルを用いて、好中球エラスターゼ低分子合成特異的阻害剤による肺虚血再灌流障害の抑制効果を検討した。

対象および方法

1. 実験動物

体重3.0~3.5kg (平均3.3kg) のニュージーランド白色種の雌性ウサギ (日本エスエルシー、静岡) 15羽を用いた。前投薬として硫酸アトロピン (田辺、大阪) 0.5mgを筋肉内注射した後、耳介の静脈に点滴路を確保し、ペントバルビタールナトリウム (田辺) 25mg/kgを緩徐に静脈内投与した。手術台に仰臥位で固定し、前頸部および前胸腹部を剃毛し、前頸部縦切開にて気管を露出した。気管切開により径6mmの気管内挿管チューブを約1.5cm挿入し固定した後、ハーバード型従量式人工呼吸器SN-480-5 (シナノ、東京) に接続した。人工呼吸器が接続されると同時に臭化パンクロニウムブロマイド (日本オルガノン、東京) 1mgを静脈内投与して非動化し、調節呼吸を行った。換気回数は30回/分、1回換気量は15~20ml/kg (片肺換気時は15ml/kg) に設定した。術中は吸入気酸素濃度 (fraction of

平成9年12月8日受付、平成10年1月13日受理

Abbreviations : CO, cardiac output; dLAP, diastolic left atrial pressure; FIO₂, fraction of inspiratory oxygen; mPAP, mean pulmonary arterial pressure; PaO₂, arterial oxygen pressure; PMN-E, polymorphonuclear elastase; PMN-E-I, polymorphonuclear elastase inhibitor; PVR, pulmonary vascular resistance; SaO₂, oxygen saturation; α_1 -AT, α_1 -antitrypsin

inspiratory oxygen, FIO_2) を 50 % ($\text{FIO}_2=0.5$) に設定した。動脈血採血用に、カットダウン法にて右総頸動脈を露出し、25G ハッピーキャス針 (メディキット, 東京) を挿入, 留置した。次いで前胸部正中に胸骨上端から剣状突起まで皮切を加え, 胸骨後面を剥離後, 胸骨を縦切開した。開胸器を用い胸壁を左右に開大し, メスにて胸膜を切開し開胸した。左右の肺靱帯を切離後, 左右の肺門に 4-0 プロレン糸 (エチコン, 東京) を用いてターニケットを回した。ヘパリンナトリウム (武田, 東京) 200 単位/kg を静脈内投与し全身ヘパリン化した。心膜を切開し心臓を露出させてから, 25G ハッピーキャス針を右心室より挿入し, 先端を肺動脈幹に留置し, 肺動脈圧測定用とした。さらに 25G ハッピーキャス針を左心房に挿入, 先端を左心房内に留置し, 左心房圧測定用とした。維持麻酔として塩酸ケタミン (三共, 東京) を 10mg/時間の濃度で持続点滴静注し, さらに麻酔深度を維持するために, 臭化パンクロニウムブロマイドおよびジアゼパム (田辺) を適宜静脈内投与した。また一側のターニケットを遮断する時には, 遮断する側の肺が十分に膨らんだ状態で行い, またその際 1 回換気量は 15ml/kg に設定を変更した。

II. 実験系の作製

左肺を虚血の対象として 3 群の実験系を作製した。

1. 対照群

左肺虚血を行わず直ちに右肺門のターニケットを遮断し, 左肺のみによる灌流を 2 時間行った ($n=3$) (図 1)。

2. 虚血群

左肺門のターニケットを遮断し, 左肺の常温 2 時間の虚血を開始した。2 時間の虚血終了後左肺門のターニケットを解放し, 左肺の虚脱が改善した時点で右肺のターニケットを遮断, すべての肺循環および換気を左肺のみで行うようにした。その後最

長 2 時間までの左肺の再灌流を行い再灌流後 2 時間の時点で実験を終了した ($n=6$) (図 1)。

3. PMN-E 阻害剤投与 (PMN-E inhibitor administration, PMN-E-I) 群

虚血群と同じ左肺虚血再灌流モデルにおいて, 実験開始と同時に再灌流時まで PMN-E の低分子合成特異的阻害剤である N-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニル]スルホニルアミノ]-ベンゾイル酢酸 (小野, 大阪) を 25mg/kg/時間点滴静注した ($n=6$) (図 1)。

III. 血行動態の測定

動脈血酸素分圧 (arterial oxygen pressure, PaO_2), 酸素飽和度 (oxygen saturation, SaO_2), 平均肺動脈圧 (mean pulmonary arterial pressure, mPAP), 拡張期左心房圧 (diastolic left atrial pressure, dLAP), 心拍出量 (cardiac output, CO), 肺血管抵抗比, 肺組織血流量を測定した。測定時間は対照群では右肺門遮断前, 右肺門遮断後 30, 60, 90, 120 分, 虚血群, PMN-E-I 群では再灌流開始前, 再灌流開始後 30, 60, 90, 120 分とした。 PaO_2 , SaO_2 の測定は右総頸動脈に挿入したハッピーキャス針から採取した動脈血で行った。mPAP, dLAP はそれぞれ肺動脈幹, 左心房に留置したハッピーキャス針をポリグラフシステム RM-6000 (日本光電, 東京) に接続して同時記録した。CO は上行大動脈に留置したドップラー血流計 T101 (アドバンス, 東京) を用い測定した。肺組織血流量はレーザー組織血流計 ALF21 (アドバンス) を用いて測定した。肺血管抵抗 (pulmonary vascular resistance, PVR) は下記の式より算出した。

$$\text{PVR} = (\text{mPAP} - \text{dLAP}) / \text{CO} \times K \quad (K, \text{定数})$$

肺血管抵抗比は右肺門遮断前の値に対する比率として算出した。

IV. 病理組織学的検討

対照群では右肺門遮断後 120 分に, 虚血群, PMN-E-I 群ではそれぞれ再灌流後 120 分に左肺を摘出し, 10 % 中性緩衝ホルマリン液による固定後にパラフィン切片を作製し, HE 染色を施行した。好中球の浸潤の程度は, - (なし), + (中等度), ++ (高度) の 3 段階に分類した。肺胞構造の破壊, 肺胞内の水腫, 出血の程度は, - (なし), + (中等度), ++ (高度) の 3 段階に分類して評価した。

V. 統計学的検討

測定結果は平均値 ± 標準偏差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) で表記した。各群の平均値の差の検定には一元配置分散分析法を, 多重比較には Sheffé の F 検定を用いた。また各群間の検定には重複測定分散分析法を用いた。危険率 5 % 未満をもって有意差ありとした。

成 績

I. 血行動態

1. PaO_2

対照群では経時的に有意な PaO_2 (mmHg) の変動を示さなかった。虚血群では再灌流開始後 PaO_2 は経時的に減少し, 再灌流開始前値に比べて再灌流後 60 分以降の PaO_2 は有意に低かった ($p < 0.01$) (表 1)。また全経過を比較して虚血群は対照群と比べて有意に PaO_2 は低かった ($p < 0.01$) (図 2)。PMN-E-I 群でも再灌流開始後 PaO_2 は経時的に減少し, 再灌流開始前値に比べて再灌流後 90 分以降の PaO_2 は有意に低かった ($p < 0.05$) (表 1)。PMN-E-I 群と虚血群を比べると, 再灌流開始後の全経

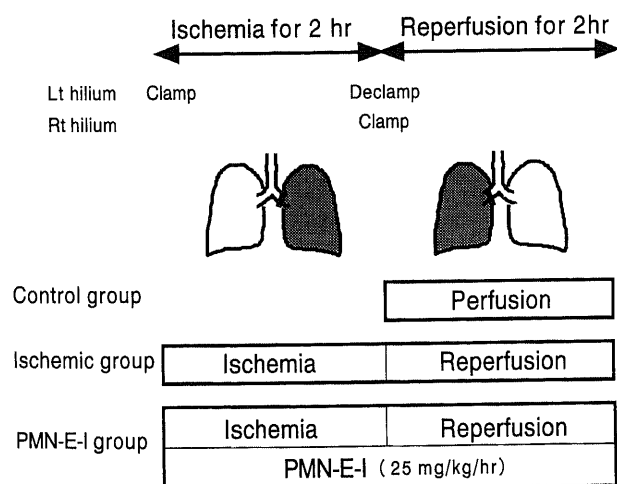


Fig. 1. Schematic illustration of the experimental groups. In control group, 2 hr single left lung perfusion was performed with no ischemia. In the ischemic group, 2 hr single left lung reperfusion after 2 hr ischemia was performed. In the PMN-E-I group, drip intravenous injection of polymorphonuclear elastase inhibitor (PMN-E-I) was performed from beginning of the experiment followed by ischemia-reperfusion as in the ischemic group.

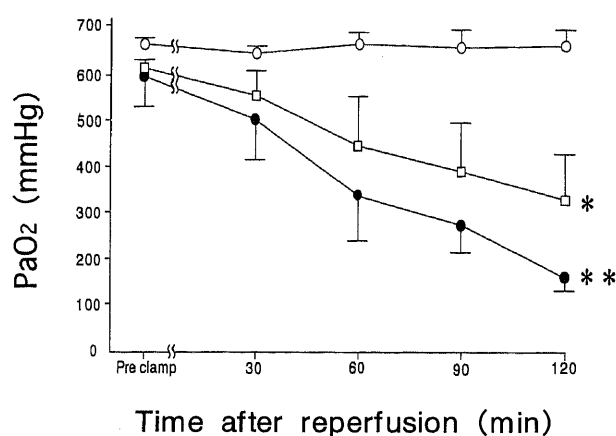


Fig. 2. Changes in PaO_2 of control group, ischemic group and PMN-E-I group. Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SD}$. \circ , control group; \bullet , ischemic group; \square , PMN-E-I group. * $P<0.05$ vs ischemic group, ** $P<0.01$ vs control group, by repeated measure ANOVA.

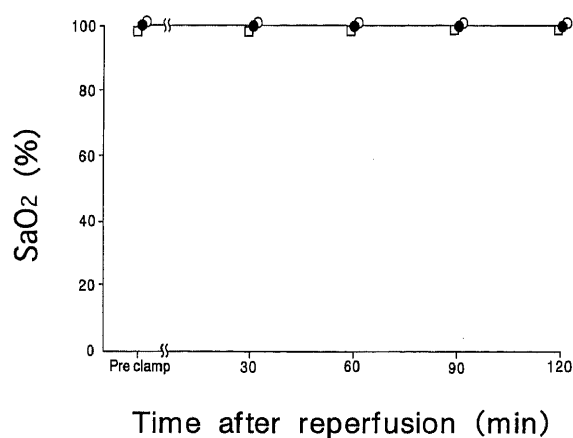


Fig. 3. Changes in SaO_2 of control group, ischemic group and PMN-E-I group. Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SD}$. \circ , control group; \bullet , ischemic group; \square , PMN-E-I group.

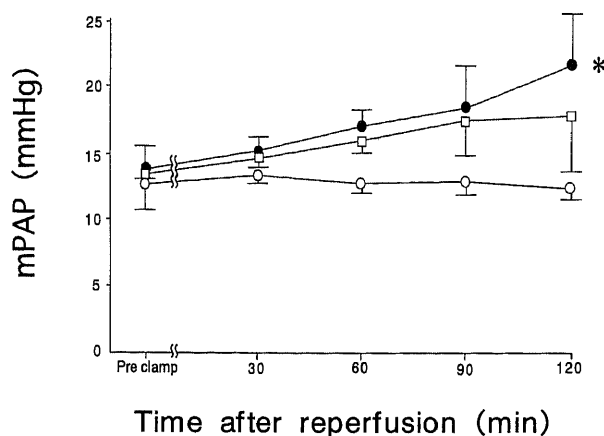


Fig. 4. Changes in mPAP of control group, ischemic group and PMN-E-I group. Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SD}$. \circ , control group; \bullet , ischemic group; \square , PMN-E-I group. * $P<0.05$ vs control group, by repeated measure ANOVA.

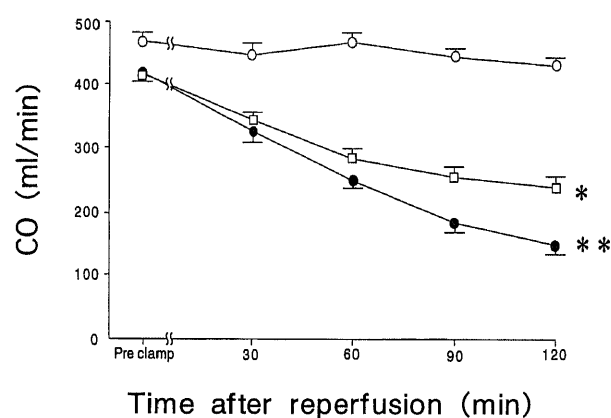


Fig. 5. Changes in CO of control group, ischemic group and PMN-E-I group. Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SD}$. \circ , control group; \bullet , ischemic group; \square , PMN-E-I group. * $P<0.05$ vs ischemic group, ** $P<0.01$ vs control group, by repeated measure ANOVA.

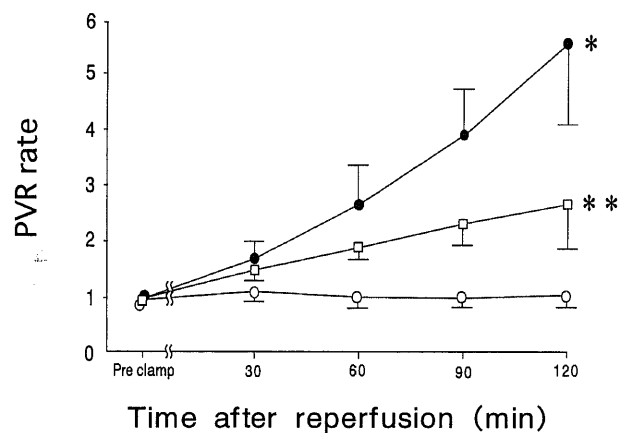


Fig. 6. Changes in PVR rate of control group, ischemic group and PMN-E-I group. Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SD}$. \circ , control group; \bullet , ischemic group; \square , PMN-E-I group. * $P<0.01$ vs control group, ** $P<0.01$ vs ischemic group, by repeated measure ANOVA.

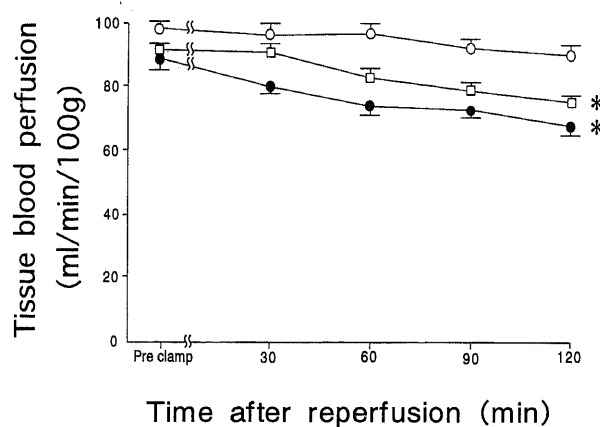


Fig. 7. Changes in tissue blood perfusion of control group, ischemic group and PMN-E-I group. Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SD}$. \circ , control group; \bullet , ischemic group; \square , PMN-E-I group. * $P<0.05$ vs ischemic group, ** $P<0.01$ vs control group, by repeated measure ANOVA.

過ではPMN-E-I群は虚血群よりも有意にPaO₂が高かった (p<0.05) (図2)。

2. SaO₂

対照群, 虚血群, PMN-E-I群とも経時的に有意なSaO₂ (%)の変動を示さなかった。また全経過の比較, 各時間毎の比較でも各群間に有意差は認めなかった (表1, 図3)。

3. mPAP

対照群では経時的に有意なmPAP (mmHg)の変動を示さなかった。虚血群では再灌流開始後mPAPは上昇し, 再灌流開始前値に比べて再灌流後120分のmPAPは有意に高かった (p<0.01) (表1)。全経過を比較して虚血群は対照群と比べて有意にmPAPが高かった (p<0.05) (図4)。PMN-E-I群でも再灌流開始後mPAPは経時的に上昇する傾向を示したが各時間間に有

意差はなかった (表1)。PMN-E-I群と虚血群を比べると, 再灌流開始後の全経過ではPMN-E-I群は虚血群よりmPAPは低い傾向を認めたが, 有意差はなかった (図4)。

4. CO

対照群では経時的に有意なCO (ml/分)の変動を示さなかった。虚血群では再灌流開始後COは減少し, 再灌流開始前値に比べて再灌流後60分以降のCOは有意に低かった (p<0.01) (表1)。全経過を比較して虚血群は対照群と比べて有意にCOは低かった (p<0.01) (図5)。PMN-E-I群でも再灌流開始後COは経時的に減少し, 再灌流開始前値に比べて再灌流後60分以降のCOは有意に低かった (p<0.01) (表1)。PMN-E-I群と虚血群を比べると, 再灌流開始後の全経過ではPMN-E-I群は虚血群よりも有意にCOは高かった (p<0.05) (図5)。

Table 1. Comparison of pulmonary function

Group	PaO ₂ (mmHg)	SaO ₂ (%)	mPAP (mmHg)	CO (ml/min)	PVR rate	Tissue blood perfusion (ml/min/100g)
Control						
Pre	652±12	99.9±0	13±2.6	463±58	1.0±0	98±8
30	635±10	99.9±0	13±0.5	450±62	1.0±0	97±6
60	647±23	99.9±0	13±0.5	468±67	1.0±0	97±11
90	645±34	99.9±0	13±1.2	450±65	1.0±0	93±11
120	643±36	99.8±0.1	12±1.2	433±49	1.0±0	90±7
Ischemia						
Pre	588±72	99.9±0.1	14±2.0	424±44	1.1±0.2	89±3
30	485±78	99.9±0.1	15±0.8	328±62	1.7±0.4	81±6
60	332±96**	99.9±0.1	17±1.7	243±63**	2.6±0.8	75±4
90	264±52**	99.9±0.1	19±2.9	181±64**	3.9±0.9**	73±6*
120	159±26**	99.8±0.1	21±4.1**	147±57**	5.8±1.5**	68±5**
PMN-E-I						
Pre	602±24	99.9±0.1	14±0.8	417±38	1.1±0.1	93±3
30	539±49	99.9±0.1	15±1.2	343±51	1.5±0.2	92±5
60	437±112	99.9±0.1	16±1.7	294±18**	1.9±0.2	84±5
90	384±127*	99.9±0.1	18±3.3	258±26**	2.3±0.4**	80±7*
120	331±117**	99.8±0.1	18±4.4	240±24**	2.7±0.8**	76±7**

Control, only interception of right hilum was done; ischemia, 2 hr single left lung reperfusion was done after 2 hr ischemia and no treatment was done; PMN-E-I, drip injection of polymorphonuclear elastase inhibitor (PMN-E-I) was done from beginning of the experiment.

Pre, before interception of right hilum; 30, 30 min after interception of right hilum; 60, 60 min after interception of right hilum; 90, 90 min after interception of right hilum; 120, 120 min after interception of right hilum.

Data are shown as $\bar{x} \pm SD$. *P<0.05; **P<0.01 vs data of pre clamp by Scheffe's F method after one-factor ANOVA.

Tabel 2. Histopathological findings of the lung

Group	No. of rabbits used	Neutrophilic infiltration		Intraalveolar change	
		Interstitial	Alveoli	Edema	Hemorrhage
Control	3	—	—	—	—
Ischemia	6	+	+	+	+
PMN-E-I	6	++	++	++	++

Control, only interception of right hilum was done; ischemia, 2 hr single left lung reperfusion was done after 2 hr ischemia and no treatment was done; PMN-E-I, drip injection of polymorphonuclear elastase inhibitor (PMN-E-I) was done from beginning of the experiment.

—, nothing; +, moderate; ++, severe.

5. 肺血管抵抗比

対照群では経時的に有意な肺血管抵抗比の変動を示さなかった。虚血群では再灌流開始後肺血管抵抗比は経時的に上昇し、再灌流開始前値に比べて再灌流後90分以降の肺血管抵抗比は

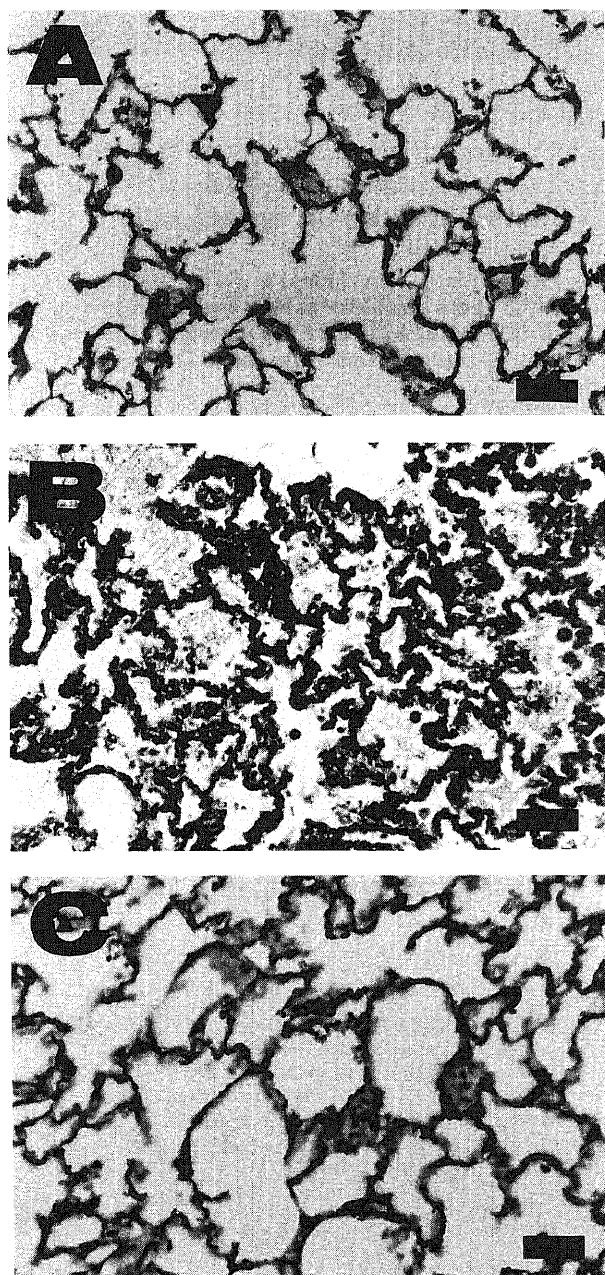


Fig. 8. Histological findings of the rabbit lung stained with hematoxylin and eosin. (A) Control group, after 2 hr interception of right hilum, shows no significant change with no evidence of neutrophilic infiltration or hemorrhage. (B) Ischemic group, after 2 hr reperfusion with no treatment. The interstitium and intraalveolar septa diffusely infiltrated by neutrophils and severe edema and hemorrhage are seen in the alveoli. (C) PMN-E-I group, after 2 hr reperfusion with drip intravenous injection of polymorphonuclear elastase inhibitor (PMN-E-I). Neutrophils were moderately scattered into the interstitium and the alveoli and mild edema fluid and hemorrhage are present in the alveoli. Scale bar indicates 50 μ m.

有意に高かった ($p < 0.01$) (表1)。また全経過を比較して虚血群は対照群と比べて有意に肺血管抵抗比は高かった ($p < 0.01$) (図6)。PMN-E-I群でも再灌流開始後肺血管抵抗比は経時的に上昇し、再灌流開始前値に比べて再灌流後90分以降の肺血管抵抗比は有意に高かった ($p < 0.01$) (表1)。PMN-E-I群と虚血群を比べると、再灌流開始後の全経過ではPMN-E-I群は虚血群よりも有意に肺血管抵抗比は低かった ($p < 0.01$) (図6)。

6. 肺組織血流量

対照群では経時的に有意な肺組織血流量 (ml/分/100g) の変動を示さなかった。虚血群では再灌流開始前値に比べて再灌流後90分以降の肺組織血流量は有意に低かった ($p < 0.05$) (表1)。全経過を比較して虚血群は対照群と比べて有意に肺組織血流量は低かった ($p < 0.01$) (図7)。PMN-E-I群でも再灌流開始後肺組織血流量は経時的に減少し、再灌流開始前値に比べて再灌流後90分以降の肺組織血流量は有意に低かった ($p < 0.05$) (表1)。PMN-E-I群と虚血群を比べると、再灌流開始後の全経過ではPMN-E-I群は虚血群よりも有意に肺組織血流量は高かった ($p < 0.05$) (図7)。

II. 組織学的所見

各群の病理組織所見を表2に示す。対照群では右肺門遮断後120分に摘出した肺に異常な所見は認めず、好中球の浸潤や赤血球の浸出は認められなかった (図8A)。虚血群で再灌流後120分に摘出した肺には肺胞隔壁および肺胞内に著明な好中球のびまん性の浸潤と肺胞内への赤血球の浸出がみられ、肺水腫は高度であった (図8B)。PMN-E-I群で再灌流後120分に摘出した肺は肺胞隔壁および肺胞内への好中球の浸潤は中等度であった。また、肺胞内への赤血球の浸出は部分的に認められるだけで、肺水腫も虚血群と比べると軽度であった (図8C)。

考 察

臓器が一定時間の虚血に陥った場合、組織の細胞、代謝過程が障害され、さらに再灌流により急激に酸素負荷が加わることにより、虚血細胞、組織に重篤な障害が惹起される。これがいわゆる虚血再灌流障害⁴⁾である。心筋梗塞、脳梗塞、四肢動脈閉塞のような臓器の虚血性疾患と同様に肺移植においても虚血再灌流障害の制御は依然として重要な問題である。

虚血再灌流障害の原因として、Tateら⁵⁾が活性酸素の関与を報告して以来、多くの臓器で再灌流障害における活性酸素の重要性が報告されてきた。活性酸素の発生源としてはヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素 (hypoxanthin-xanthin oxidase) 系の関与が報告されており^{5) 6)}、抗酸化剤であるスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase) やカタラーゼなどの投与が活性酸素の抑制に有用であったとする報告もある^{7) 14)}。またキサンチン酸化酵素の阻害剤であるアロプリノール^{6) 14) 15)}の投与により再灌流障害が抑制されたという報告もあり、これらは活性酸素が虚血再灌流障害の原因であるという説を裏付けるものとなった。しかし、Bishopら¹⁶⁾がキサンチン酸化酵素の阻害剤で再灌流性肺血管障害を抑制できなかったと報告するように、肺虚血再灌流障害を単にヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系の関与で説明することは難しい。

近年、活性酸素の産生源としてヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系だけでなく、好中球 NADPH オキシダーゼ (reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase) 系^{17) 18)} やアラキドン酸系¹⁹⁾ も注目され、活性酸素産

生における好中球の関与が示されている。また、肺虚血再灌流障害における好中球の役割に関してはこれまでに多くの報告^{20)~21)}とともに、好中球由来のサイトカインの重要性^{23)~24)}が指摘されるようになった。好中球が骨髓幹細胞から成長する過程で前骨髓球になると細胞質中に一次顆粒、好中球になると二次顆粒が多く出現する。一次顆粒はミエロペプチダーゼ、アシドヒドロラーゼ、プロテアーゼ、コラゲナーゼが主であり、二次顆粒はリゾチーム、特異的コラゲナーゼ、ラクトフェリンが主である。プロテアーゼの中で、中性プロテアーゼにはPMN-E、カテプシンG、コラゲナーゼなどがあり、これらは活性型として好中球から放出され組織障害を惹起する。さらに最近になって好中球がアラキドン酸代謝産物や血小板活性化因子(platelet activating factor)のほか、インターロイキン-1(interleukin-1)²³⁾、インターロイキン-8(interleukin-8)²⁴⁾、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor)²⁵⁾などのサイトカインを大量に産生することが次々に明らかにされており、インターロイキン-8の虚血再灌流障害における好中球浸潤への関与をSekidoら²⁶⁾が報告している。

好中球の放出する中性プロテアーゼの中でも、1968年Janoffら²⁷⁾によって証明された極めて強力な蛋白分解酵素であるPMN-Eは臓器障害に最も関与する物質のひとつであると考えられている。PMN-Eは分子量33000のセリンプロテアーゼの1つであり、広い特異性をもった酵素としてエラスチン、非可溶性コラーゲン、軟骨プロテオグリカン、細菌壁脂質など多くの蛋白質のペプチド結合を加水分解し、細菌や異物に対しても強い蛋白分解を行い生体防御にとって極めて重要な役割を果たす。しかし、PMN-Eは基質特異性が低く、血漿蛋白、凝固因子、補体、不溶性エラスチン、プロテオグリカン、天然コラーゲンなどの多くの蛋白を容易に分解し正常細胞も傷害する²⁸⁾。すなわち、PMN-Eによる生体防御反応は他方では正常組織破壊に関与している。肺においてPMN-Eは、間質成分である弾性線維のうちエラスチン線維に作用しこれを分解する。

このような過剰な生体防御反応に対し、血液、体液、組織液中にはPMN-E活性を阻害する強力なインヒビターが大量に存在し、生理的な抑制機構が働いている。PMN-Eの生体内インヒビターとしては、 α_1 -アンチトリプシン(α_1 -antitrypsin, α_1 -AT)、 α_2 -マクログロブリン(α_2 -macroglobulin)およびインター- α -トリプシン・インヒビター(inter- α -trypsin inhibitor)の3種の血漿プロテアーゼ・インヒビターと種々の組織・体液中に存在する分泌性白血球プロテアーゼ・インヒビター(secretory leucocyte protease inhibitor)などが知られている。この中でも α_1 -ATは血中濃度が最も高く、PMN-E阻害速度も最も速く、好中球から放出されたPMN-Eの90%は α_1 -ATによって活性を阻害される²⁹⁾。これまでのところPMN-E阻害剤としては内因性インヒビターである α_1 -AT以外に臨床応用されたものはなかった。

そこで筆者は好中球エラスターゼの特異的阻害作用を有する合成急性循環不全剤であるN-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニル]スルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸に注目し、肺虚血再灌流障害に対する効果を検討した。これは分子式 $C_{20}H_{21}N_2NaO_7SNa \cdot 4H_2O$ 、分子量528.51の好中球エラスターゼ低分子合成阻害剤である。生体に存在する活性阻害物質に比べ分子量が極めて小さく、活性酸素などによって酸化不活化されずにヒトのPMN-Eを競合的に阻害し、イヌ、ウサギ、ハム

スター、マウス、ラットのPMN-Eも阻害する。さらにトリプシン、トロンピン、プラスミン、血漿カリクレイン、臍カリクレイン、カテプシンG、キモトリプシン等他のプロテアーゼの阻害作用は示さず、PMN-Eにのみ特異的に作用する³⁰⁾。これまでに、リボサッカライドの投与による成人型呼吸促進症候群の発症³¹⁾、エンドトキシンに起因する肺機能の低下³²⁾、ロイコトリエンB₄による肺水腫の発症³³⁾、気管支喘息における気道抵抗の上昇³⁴⁾、肝虚血再灌流障害による肝組織血流低下³⁵⁾においてN-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニル]スルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸による抑制効果が認められている。

本研究においては虚血群では対照群と比較し血行動態の悪化を認めるとともに病理組織学的にも著明な肺水腫、好中球の浸潤、肺胞内出血を認めた。虚血中に微小血管に吸着した好中球は、血管内皮細胞の障害³⁶⁾、再灌流後の血管攣縮、白血球の付着による微小循環障害³⁷⁾、活性化した好中球の毛細血管腔閉塞による赤血球流入障害³⁸⁾を引き起こす。このとき障害を受けるのは血管内膜間接合部のもっとも脆弱な再灌流域の肺動脈であり³⁹⁾、活性化された好中球は活性酸素の生成とともにライソゾームからPMN-Eなどのプロテアーゼを放出する。この結果、肺結合組織、肺胞および血管内皮細胞基底膜の構成成分である弾性線維が分解され⁴⁰⁾、蛋白質を含む血漿が毛細血管外に漏出し浸透圧を上昇させ、透過性亢進型の肺水腫を生じると考えられる^{41)~43)}。血管内皮細胞の障害に起因して、肺の組織酸素濃度が低下することにより生じた浮腫性、出血性の変化は肺の非換気領域を生じさせる。虚血群における低酸素血症はこの領域の肺水腫が主因であると考えられた。また同群における肺血管抵抗の上昇は初期は血管内皮細胞の腫脹や血管攣縮により、後期には好中球の血管内皮への接着、凝集が原因であると思われる。

PMN-E-I群では虚血群と比較してPaO₂、COおよび肺組織血流は有意に高く、肺血管抵抗比は有意に低値であった。病理組織学的にもPMN-E-I群では虚血群に比べて肺胞隔壁および肺胞内への好中球の浸潤は軽度で、肺胞内への赤血球の浸出、肺水腫も抑制されていた。このことから、N-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニル]スルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸の投与によりPMN-Eの上昇が直接抑制され肺虚血再灌流障害が抑制されたものと考えられた。肺虚血再灌流障害は活性化した好中球から放出された活性酸素やPMN-Eなどのプロテアーゼによる内皮細胞傷害が原因と考えられるが^{44)~46)}、このうちPMN-EやカテプシンGには活性酸素の産生能を増強する作用があるといわれている⁴⁷⁾。これらの活性酸素、ミエロペルオキシダーゼ、ラクトフェリンなどは α_1 -ATの活性中心にあるメチオニン残基を酸化することにより、 α_1 -ATがPMN-Eと結合できないようにしている⁴⁸⁾。N-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニル]スルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸の投与によってPMN-Eが特異的に阻害されると、このようなオートクライン(autocrine)ないしパラクライン(paracrine)の作用による活性酸素の産生も抑制され、PMN-E阻害作用はさらに増強すると考えらる。

結 論

ウサギ肺虚血再灌流モデルを作製し、好中球エラスターゼ特異的阻害剤、N-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニル]

ルスルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸の虚血再灌流障害に対する抑制効果を検討した。ウサギを用い対照群、虚血群、実験開始と同時にN-[2-[4-(2,2-ジメチルプロピオニルオキシ)フェニル]スルフォニルアミノ]-ベンゾイル]酢酸を点滴静注し、虚血再灌流を行ったPMN-E-I群の3群を作製し比較検討した。血行動態、病理組織学的観点から検討を加え、以下の結果を得た。

1. 虚血群は対照群と比較して、 PaO_2 、COおよび肺組織血流量は経時的に有意に低下し、mPAPおよび肺血管抵抗比は経時的に有意に上昇した。 SaO_2 は両群間に有意差を認めなかった。病理組織学的には虚血群は対照群と比べて肺胞隔壁および肺胞内に著明な好中球のびまん性の浸潤を認め、また肺胞内への赤血球の浸出、肺水腫も著明であった。

2. 好中球エラストーゼ特異的阻害剤を投与したPMN-E-I群は虚血群と比較して経時的に有意に PaO_2 、COおよび肺組織血流は高く、肺血管抵抗比は経時的に有意に低かった。mPAPはPMN-E-I群が虚血群より高値を示す傾向が見られた。 SaO_2 は両群間に有意差を認めなかった。病理組織学的にはPMN-E-I群は虚血群と比べて肺胞隔壁および肺胞内への好中球の浸潤、肺胞内への赤血球の浸出、肺水腫は軽度であった。

以上の結果より、好中球エラストーゼ特異的阻害剤は肺虚血再灌流障害の抑制に有用であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なる御指導、御校閲を賜りました渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また、病理学的検討に際し御助言、御指導を賜りました病理学第一講座大井章史助教授、統計学的処理について御指導を賜りました衛生学講座谷井秀治助教授に心から感謝の意を表します。さらに実験の御指導、御教示を賜りました小田誠博士に心からの感謝の意を表します。併せて本研究にご協力いただきました外科学第一講座各位に深く感謝致します。

文 献

- 1) Stachura J, Tarnawski A, Ivey KJ, Mach T, Bogdal J, Szczudrawa J, Klimczyk B. Prostaglandin protection of carbon tetrachloride-induced liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology* 81: 211-217, 1981
- 2) Toda N, Nakajima M, Okamura T, Miyazaki M. Interaction of thromboxane A_2 analogs and prostaglandins in isolated dog arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 8: 818-826, 1986
- 3) 竹川節男. 肝虚血時の細胞障害の発生機序の実験的検討. *肝臓* 30: 459-467, 1989
- 4) 蘇原泰則. 再灌流性肺血管障害. *医学のあゆみ* 157: 301-304, 1991
- 5) Tate RM, Vanbenthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF, Repine JE. Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 126: 802-806, 1982
- 6) McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985
- 7) Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81: 22-29, 1981
- 8) Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Factors determining successful liver preservation for transplantation. *Ann Surg* 181: 289-298, 1975
- 9) Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP.

Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 40: 584-590, 1985

- 10) Adkinson D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 548: 101-107, 1986
- 11) Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ. Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: Protection by allopurinol. *Hepatology* 8: 585-590, 1988
- 12) Paull DE, Keagy BA, Kron EJ, Wilcox BR. Reperfusion injury in the lung preserved for 24 hours. *Ann Thorac Surg* 47: 187-192, 1989
- 13) Grosso MA, Brown JM, Viders DE, Mulvin DW, Banerjee A, Verasco SE, Repine JE, Harken AH. Xanthine oxidase-derived oxygen radicals induce pulmonary edema via direct endothelial cell injury. *J Surg Res* 46: 355-360, 1989
- 14) Horgan MJ, Lum H, Malik AB. Pulmonary edema after pulmonary artery occlusion and reperfusion. *Am Rev Respir Dis* 140: 1421-1428, 1989
- 15) Lynch MJ, Grum CM, Gallagher KP, Bolling SF, Deeb GM, Morganroth NL. Xanthine oxidase inhibition attenuates ischemic-reperfusion lung injury. *J Surg Res* 44: 538-544, 1988
- 16) Bishop MJ, Kowalski TF, Guidotti SM, Harlan JM. Lung reperfusion in dogs causes bilateral lung injury. *J Appl Physiol* 63: 942-950, 1987
- 17) Bando K, Pillai R, Cameron DE, Brawn JD, Winkelstein JA, Hutchins GM, Reitz BA, Baumgartner WA. Leukocyte depletion ameliorates free radical-mediated lung injury after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 99: 873-877, 1990
- 18) Shasby DM, Vanbenthuyzen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurtry I, Repine JE. Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: Role of oxygen radicals. *Am Rev Respir Dis* 125: 443-447, 1982
- 19) 藤田 直, 藤本陽子. アラキドン酸カスケードとラジカル過酸化反応. *日臨* 46: 2155-2160, 1988
- 20) Ide H, Ino T, Hasegawa T, Matsumoto H. The role of Leukocyte depletion by in vivo use of leukocyte filter in lung preservation after warm ischemia. *Angiology* 41: 318-327, 1990
- 21) Uthoff K, Zehr KJ, Lee PC, Low RA, Baumgartner WA, Cameron DE, Stuart RS. Neutrophil modulation results in improved pulmonary function after 12 and 24 hours of preservation. *Ann Thorac Surg* 59: 7-13, 1995
- 22) Stachura J, Taranawski A, Ivey KJ, Mach T, Bogdal J, Szczudrawa J, Klimczyk B. Prostaglandin protection of carbon tetrachloride-induced liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology* 8: 211-217, 1981
- 23) Tiku K, Tiku ML, Skosey JL. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 136: 3677-3685, 1986
- 24) Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amount of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8.

- J Exp Med 173: 771-774, 1991
- 25) Dubravec DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor α . Proc Natl Acad Sci USA 87: 6758-6761, 1990
 - 26) Sekido N, Mukaida N, Uarada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. Nature 365: 654-657, 1993
 - 27) Janoff A, Zeligs JD. Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes. Science 161: 702-705, 1968
 - 28) Janoff A. Elastase in tissue injury. Ann Rev Med 36: 207-216, 1985
 - 29) 吉田 哲. α_1 アンチプロテアーゼ (α_1 -Pi) と呼吸器疾患. 呼と循 32: 756-765, 1984
 - 30) Kawabata K, Suzuki M, Sugitani M, Imai K, Toda M, Miyamoto T. ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. Biochem Biophys Res Commun 177: 814-820, 1991
 - 31) 永井厚志, 安井修司, 松宮晴子, 金野公郎. 成人呼吸促迫症候群モデル動物におけるエラスターゼ特異的インヒビター (ONO-5046) の効果. 医学のあゆみ 160: 257-258, 1992
 - 32) Kubo K, Kobayashi T, Hayano T, Koizumi T, Honda T, Sekiguchi M, Sakai A. Effects of ONO-5046, a specific neutrophil elastase inhibitor, on endotoxin-induced lung injury in sheep. J Appl Physiol 77: 1333-1340, 1994
 - 33) Yoshimura K, Nakagawa S, Koyama S, Kobayashi T, Homma T. Roles of neutrophil elastase and superoxide anion in leukotriene B₄-induced lung injury in rabbit. J Appl Physiol 76: 91-96, 1994
 - 34) Fujimoto K, Kubo K, Shinozaki S, Okada K, Matsuzawa Y, Kobayashi T, Sugane K. Neutrophil elastase inhibitor reduces asthmatic responses in allergic sheep. Respir Physiol 100: 91-100, 1995
 - 35) 米丸哲吉. 肝虚血-再灌流障害における好中球エラスターゼの関与. 東邦医会誌 41: 372-389, 1994
 - 36) Suematsu M, Miura S, Suzuki M, Nagata H, Morishita T, Oshio C, Tsuchiya M. 5-Lipoxygenase inhibitor (AA-861) attenuates neutrophil-mediated oxidative stress on the venular endothelium in endotoxemia. J Clin Lab Immunol 25: 41-45, 1988
 - 37) Ueda Y, Matsuo K, Kamei T, Kayashima K, Konomi K. Protective effect of prostaglandin E1 (PGE1) on energy metabolism and reticuloendothelial function in the ischemically damaged canine liver. Liver 9: 6-13, 1989
 - 38) Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in dog. Am J Pathol 3: 98-111, 1983
 - 39) Schneeberger EE, Karnovsky MJ. Substructure of intercellular junctions in freeze-fractured alveolar-capillary membranes of mouse lung. Circ Res 38: 404-411, 1976
 - 40) Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH. Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules. J Biol Chem 255: 5435-5441, 1980
 - 41) Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. Am Rev Respir Dis 116: 469-475, 1977
 - 42) 小川道雄. 好中球の活性化と臓器障害—エラスターゼの作用を中心に—. 集中治療 2: 67-83, 1989
 - 43) Dahinden C, Galanos C, Fehr J. Granulocyte activation by endotoxin. Correlation between adherence and other granulocyte function, and role of endotoxin structure on biologic activity. J Immunol 130: 857-862, 1983
 - 44) Weiss SJ, Curnutte JT, Regiani S. Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix: Oxidative and nonoxidative mechanisms of proteolysis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes. J Immunol 136: 636-641, 1986
 - 45) Cochrane CG, Spragg R, Revak SD. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome; Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Invest 71: 754-761, 1983
 - 46) 小川道雄. ARDSのメカニズム. mebio: 18-26, 1990
 - 47) Kusner DJ, King CH. Protease-modulation of neutrophil superoxide response. J Immunol 143: 1696-1702, 1989
 - 48) Matheson NR, Wong PS, Travis J. Enzymatic inactivation of human α -1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. Biochem Biophys Res Commun 88: 402-409, 1979

Effects of Specific Neutrophil Elastase Inhibitors in Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbit Lung Norihiko Ishikawa, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 107, 24 — 32 (1998)

Key words ischemia-reperfusion injury, polymorphonuclear elastase, lung transplantation, neutrophil infiltration, specific neutrophil elastase inhibitor

Abstract

Ischemia-reperfusion injury remains a significant problem in lung transplantation. Superoxides and neutrophils are considered as the major etiologic factors in ischemia-reperfusion injury. Polymorphonuclear elastase (PMN-E) derived from neutrophils, especially, plays a major role in ischemia-reperfusion injury. To determine the effects of a specific neutrophil elastase inhibitor in ischemia-reperfusion lung injury, 15 rabbits were divided into 3 groups: 2 hr single left lung perfusion (Control group, n=3), 2 hr single left lung reperfusion followed by 2 hr ischemia (Ischemic group, n=6), and drip intravenous injection of a specific neutrophil elastase inhibitor started from the beginning of the experiment, followed by ischemia-reperfusion as in the ischemic group (PMN-E-I group, n=6). The ischemic group showed significantly lower arterial oxygen pressure (PaO₂), cardiac output (CO) and tissue blood perfusion, and significantly higher mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and pulmonary vascular resistance rate (PVR rate) after reperfusion, compared with those in the control group. Histopathological features of the ischemic group revealed diffuse infiltration of neutrophils in the interstitium and the intraalveolar septa, severe pulmonary edema and hemorrhage in the alveoli. In the PMN-E-I group, PaO₂, CO and tissue blood perfusion were significantly higher and PVR rate was significantly lower after reperfusion than those in the ischemic group. Histopathological features of the PMN-E-I group revealed large decreases in neutrophil infiltration, pulmonary edema and intraalveolar hemorrhage compared to those of the ischemic group. These results suggest that treatment with a specific neutrophil elastase inhibitor improves lung function in the rabbit lung ischemia-reperfusion model.